

25S rDNA 在杨属植物染色体上的定位^{*}

董凤平¹, 韩素英², 张守攻², 齐力旺²,
刘 博¹, 李秀兰¹, 陈成彬^{1**}

(1 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2 中国林业科学院林业研究所细胞生物学实验室, 北京 100091)

摘要: 利用荧光原位杂交技术对杨属 (*Populus*) 植物五个组中二倍体 ($2n = 2x = 38$) 代表种: 毛白杨 (*P. tomentosa*)、箭杆杨 (*P. nigra* var. *thevestina*)、大叶杨 (*P. lasiocarpa*)、小青杨 (*P. pseudo-simonii*)、胡杨 (*P. euphratica*); 以及所发现的白杨组和黑杨组天然三倍体 ($2n = 3x = 57$): 毛白杨 (*P. tomentosa*)、武黑 1 号 (*P. euramericana* cv. Wuhei-1) 进行了 25S rDNA 的染色体定位。二倍体毛白杨、箭杆杨、小青杨和大叶杨都具有 4 个 25S rDNA 位点, 而胡杨只有 2 个较大的 25S rDNA 定位于 1 对小的染色体上, 白杨和黑杨天然三倍体的两个种各有 6 个 25S rDNA 位点。同时作者还将杨属植物 25S rDNA 的分布变化与常规核型分析结果进行了比较。

关键词: 杨属; 荧光原位杂交; 25S rDNA 定位

中图分类号: Q 942

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2007) 04-423-06

Physical Mapping of 25S rDNA on Metaphase Chromosomes of *Populus* (Salicaceae) in Five Sections by Fluorescence *in Situ* Hybridization

DONG Feng-Ping¹, HAN Su-Ying², ZHANG Shou-Gong², QI Li-Wang²,
LIU Bo¹, LI Xiu-Lan¹, CHEN Cheng-Bin^{1**}

(1 College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2 Laboratory of Cell Biology, the Research Institute of Forestry, the Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: This study examined the physical localizations of the 25S rDNA on the mitotic metaphase chromosomes of seven species in the five sections of *Populus*, using fluorescence in situ hybridization (FISH). Four 25 rDNA loci were detected on the chromosomes of five wild diploid species ($2n = 2x = 38$), *P. tomentosa*, *P. nigra* var. *thevestina*, *P. pseudo-simonii*, *P. lasiocarpa* and *P. euphratica*. Six 25 rDNA loci were detected on the chromosomes of two wild triploid species ($2n = 3x = 57$), *P. tomentosa* in section *Leuce* and *P. euramericana* cv. Wuhei-1 in section *Aigeiros*. While only one pair of 25 rDNA loci located at the smallest chromosome was detected in *P. euphratica* chromosomes. Coupled with the approach of common karyotype analysis, this article also discusses the variations of 25S rDNA distribution on *Populus* chromosomes.

Key words: *Populus*; Fluorescence *in situ* hybridization (FISH); 25S rDNA loci

核糖体 RNA 基因 (rDNA) 是植物基因组中研究最广泛的遗传单元之一。rDNA 是拷贝数很高 (500 ~ 40 000) 的串联重复序列, 成簇分布于

一个或数个位点 (Long and Dawid, 1980; Pedersen and Linde-laursen, 1994)。25S rDNA 是 45S rDNA 基因重复单位中的一员, 位于核仁组织区

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30571517) 及天津市自然科学基金 (07CYBJC11700) 资助项目

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: chencb@nankai.edu.cn; 电话: 022-23508241

收稿日期: 2006-12-22, 2007-02-25 接受发表

作者简介: 董凤平 (1982-) 男, 硕士研究生, 分子细胞遗传学研究方向。

(NOR) 上。由于 rDNA 序列在真核生物中高度保守并且拷贝数高,应用荧光原位杂交 (FISH) 技术可以很方便的进行观察和定位。对于具有较多小染色体和形态对称染色体的植物物种, 25S rDNA 是进行染色体组型分析的非常好的细胞学标记 (Schrader 等, 2000)。rDNA 序列虽然高度保守,但在其数目和染色体上的物理位置在进化过程中并非一成不变,即使在同一属或亚属的近缘种中也存在着差异。

杨属 (*Populus*) 植物具有基因组较小、物种丰富、生长迅速、再生能力强等特性而成为木本植物研究中模式物种的首选 (Bradshaw and Stettler, 1995; Taylor, 2002)。在我国,杨树分布极为广泛,是最重要的用材树种之一,并在城市绿化中具有防沙滞尘功能,是园林绿化的首选树种。国际上较公认的杨属植物约含 30 个生物种 (Eckenwalder, 1996),分为五组 (五派): 白杨组 (Section *Leuce*)、黑杨组 (Section *Aigeiros*)、青杨组 (Section *Tacamahaca*)、大叶杨组 (Section *Leucoides*) 和胡杨组 (Section *Turanga*)。其中,在白杨组和黑杨组中都发现了天然三倍体植株 (陈成彬等, 2004)。对于杨属植物,陈成彬等 (2005) 及齐力旺等 (2004) 已对其进行了核型分析,但是杨树的染色体较小数量较多,传统的核型分析无法准确的显示染色体 NOR 区的数量并对其进行准确的定位,本文以 25S rDNA 作为探针在杨属植物 5 个组 7 个种 (含品种) 的中期染色体上进行原位杂交定位,并对 25S rDNA 在杨属植物染色体上的数量、分布及种间差异,与常规的核型分析进行了比较,为研究杨属植物进化过程中染色体 NOR 区变化及其相连染色体的变异提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

杨属五组中的二倍体 ($2n=2x=38$) 代表种和白杨组和黑杨组中天然三倍体 ($2n=3x=57$) 共 7 种植物,名称及来源见表 1,凭证标本存南开大学生命科学学院标本室。

1.2 杨树品种和染色体标本的制备

7 种材料均取自杨树植物的幼芽。材料用含有饱和 - 溴代萘与饱和对二氯苯的水溶液 25 预处理 3 h,之后用固定液 (甲醇 冰醋酸 = 3 1) 固定。染色体标本的制备采用陈瑞阳等 (1979) 的去壁低渗法。选取染色体形态和分散较好的标本用于荧光原位杂交。

1.3 荧光原位杂交

25S rDNA 片断来自拟南芥 25S rDNA 的一个 2.3 kb 的亚克隆 (Unfried and Gruendler, 1990)。通过随机引物法用 DIG (Digoxigenin-dUTP, Roche) 标记 25S rDNA 作为探针。杂交及杂交后信号的检测按 Qi 等 (2002) 的方法进行。

2 结果

7 个种的中期染色体 25S rDNA 的荧光原位杂交及核型分析见图 1、2。杨属植物除胡杨组外,白杨组、黑杨组、青杨组和大叶杨组的二倍体种都具有 4 个杂交信号,白杨组和黑杨组的天然三倍体都具有 6 个杂交信号,所有杂交信号均位于染色体短臂的端部,信号的强弱相近,而大小不同。

3 讨论

核糖体 RNA 基因 (rDNA) 所定位的染色体是物种染色体组中的一个重要成员。由于 25S rDNA 一般都定位在染色体的随体位置,在染色体组研究及核型分析中携带随体的染色体一般最易与其他染色体相区别,并且由于不同类型品种之间,随体染色体数目可能存在一定的差异。因此,研究随体染色体的数目及其在染色体组中的编号位置对于研究杨属植物的起源分化规律具有一定指导意义。

表 1 供试材料的名称及来源
Table 1 The name and origin of experimental materials

组 Section	种名 Species	凭证标本 Voucher	来源 Origin
白杨组 <i>Leuce</i>	毛白杨 <i>P. tomentosa</i> ($2n=2x=38$)	齐力旺 L. W. Qi 03-4	山西大同 Datong, Shanxi
	毛白杨 <i>P. tomentosa</i> ($2n=3x=57$)		
黑杨组 <i>Aigeiros</i>	箭杆杨 <i>P. nigra</i> var. <i>thevestina</i> ($2n=2x=38$)	齐力旺 L. W. Qi 03-97	山西大同 Datong, Shanxi
	武黑 1 号 <i>P. euramericana</i> cv. Wuhei-1 ($2n=3x=57$)	陈瑞阳 R. Y. Chen 03-1	天津武清 Wuqing, Tianjin
青杨组 <i>Tacamahaca</i>	小青杨 <i>P. pseudo-simonii</i> ($2n=2x=38$)	齐力旺 L. W. Qi 03-51	辽宁大连 Dalian, Liaoning
大叶杨组 <i>Leucoides</i>	大叶杨 <i>P. lasiocarpa</i> ($2n=2x=38$)	齐力旺 L. W. Qi 03-47	湖北建始 Jianshi, Hubei
胡杨组 <i>Turanga</i>	胡杨 <i>P. euphratica</i> ($2n=2x=38$)	齐力旺 L. W. Qi 03-132	山西大同 Datong, Shanxi

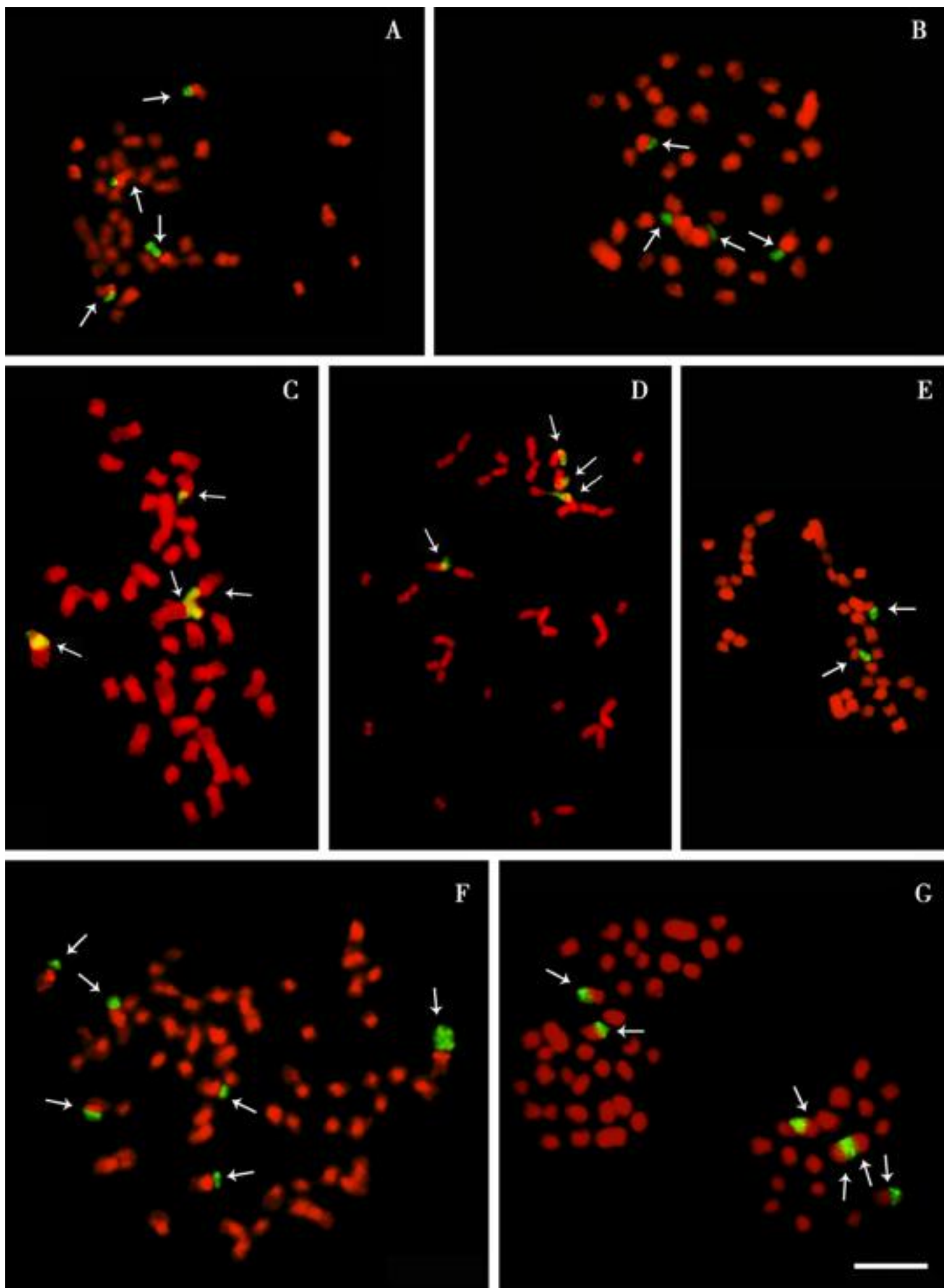


图 1 25S rDNA 与 7 种植物中期染色体的荧光原位杂交结果

Fig . 1 Fluorescence in situ hybridization with 25S rDNA on metaphase chromosomes of the seven species

A . *P. tomentosa* ($2n = 2x = 38$) ; B . *P. nigra* var. *thevestina* ; C . *P. pseudo-simonii* ; D . *P. lasiocarpa* ; E . *P. euphratica* ;
F . *P. tomentosa* ($2n = 3x = 57$) ; G . *P. euramericana* cv . Wuhei-1 (bar = 5 μm)

3.1 结合 rDNA 位点的核型分析和与传统核型分析的比较

根据陈成彬等 (2005) 对杨属植物的常规核型分析, 发现杨属五组之间核型基本结构十分相近, 按 Stebbins (1971) 的核型分类标准, 杨属植

物均为 2B 类型, 为较不对称的类型, 即由对称核型向不对称核型发展。

常规核型分析依据光镜下观察染色体标本, 确定染色体的类型、随体数目并进行配对组合。但是这种方法有时存在一定的不准确性, 尤其对

于那些随体并不明显的染色体配对, 会产生一些困难。对具有形态相近小染色体的杨属植物, 在应用 FISH 技术对 rDNA 重复序列进行染色体定位分析后, 发现其 25S rDNA 位点数目与常规核型分析得出的随体数目并不完全相同。

毛白杨二倍体: 2 对杂交信号位于 3 号和 8 号中部着丝粒染色体的短臂端部。而毛白杨核型公式为: $1M + 27m + 2sm + 6st + 2t$ (齐力旺等, 2005), 没有观察到随体, 25S rDNA 的荧光原位杂交后发现在 3 号染色体上有一对较明显的随体存在, 其中一个随体较大, 形成了一对异型随体。第 8 号染色体上的随体杂交信号相对 3 号染色体上的信号较小 (图 2: A)。

箭杆杨: 核型结果分析表明箭杆杨核型公式为: $3M + 29m (2SAT) + 5sm + 1st$ (陈成彬等, 2005), 只观察到一对染色体具随体。而 25S rDNA 的荧光原位杂交结果显示, 有 2 对染色体带有荧光杂交信号分别位于 3 号和 7 号中部着丝粒染色体的短臂端部。3 号染色体随体相对 7 号 rDNA 荧光原位杂交信号较大 (图 2: B)。

小青杨: 荧光原位杂交信号位于 2 号近中部着丝粒染色体和 11 号近端部着丝粒染色体的短臂端部。小青杨核型公式: $27m + 6sm (1SAT) + 4st (2SAT) + 1t$, 观察到 3 条具随体染色体。荧光原位杂交结果清楚的显示出 25S rDNA 定位于 2 号染色体和 11 号染色体上, 其中 2 号染色体的信号较大和较强 (图 2: C)。

大叶杨: 荧光原位杂交信号位于 4 号和 7 号近端部着丝粒染色体的短臂端部。核型分析结果显示, 大叶杨核型公式为: $2M + 22m + 8sm + 6st$, 未发现具有随体染色体, 荧光原位杂交结果显示在大叶杨 4 号染色体近端部着丝粒处具有一对较明显的随体。相对较小的 25S rDNA 信号定位于 7 号近端部着丝粒染色体上 (图 2: D)。

胡杨: 只有 1 对较大的荧光原位杂交信号位于最小的 19 号近端部着丝粒染色体的短臂端部, 与胡杨核型分析结果: $2M + 23m + 3sm + 10st (2SAT)$ 相一致。胡杨的随体大小要超过其所定位的染色体大小 (图 2: E)。

毛白杨三倍体: 25S rDNA 荧光原位杂交信号位于 6 号和 7 号近中部着丝粒染色体的短臂端部。毛白杨三倍体常规核型公式为: $1M + 31m +$

$10sm + 15st$ (陈成彬等, 2004), 没有观察到随体染色体, 荧光原位杂交结果显示 6 号染色体具有较明显的随体, 7 号染色体的随体大小和信号强度都稍小于 6 号染色体 (图 2: F)。

武黑 1 号: 25S rDNA 荧光杂交信号位于 8 号中部着丝粒染色体和 10 号近中部着丝粒染色体的短臂端部。武黑 1 号核型公式为: $2M + 38m (4SAT) + 14sm (2SAT) + 3st$, 其显示的随体数目与荧光原位杂交的 25S rDNA 位点数目一致 (图 2: G)。

本研究结果清楚的显示了杨属 5 个组的二倍体和天然三倍体的 25S rDNA 的分布情况, 与 PI 复染中所显示的随体所在位置一致 (未显示), 有些随体由于染色体高度折叠压缩的原因而没有被观察到。rDNA 探针的染色体荧光原位杂交与核型分析相结合, 可对核型分析结果进行校正, 提高同源染色体配对的准确性。

3.2 杨属植物 25S rDNA 位点数目和位置变化的比较

植物属内 rDNA 位点数目和位置的变化已经在很多植物中观察到, 例如在豆科 (Leguminosae) 的三个属 (刘博等, 2005), 菜豆属 *Phaseolus* (Galasso 等, 1995; Pedrosa 等, 2003), 碧冬茄属 *Petunia* (Benabdelmouna 等, 1997), 棉属 *Gossypium* (Ji 等, 1999), 栎属 *Quercus* (Zoldos 等, 1999), 豇豆属 *Vigna* (Moscone 等, 1999) 的属内不同种或野生种与栽培种之间 rDNA 数目和位置都存在着差异。对杨属植物 5 个组的二倍体和三倍体的 25S rDNA 的数目和形态进行比较, 发现毛白杨二倍体、箭杆杨、小青杨、大叶杨、毛白杨三倍体和武黑 1 号具有相似的 25S rDNA 分布特征, 都具有 2 组可配对的 25S rDNA 位点 (二倍体为 4 个, 三倍体为 6 个), 信号在形态大小上表现为其中一组要大于另一组, 只是信号在染色体组中的排列位置不同; 而胡杨则只有 1 对大的 25S rDNA 位点, 并位于最小的 19 号近端部着丝粒染色体上, 而其它六种杨属植物, 携带较大杂交信号的一组同源染色体较大, 排列顺序比较靠前。与其它组杨属植物不同的是, 毛白杨的二倍体和三倍体以及胡杨中, 较大的随体本身还具有一个缢痕 (图 2: A, E, F), 称为衔接随体 (洪德元, 1990)。

从胡杨的分子核型分析中可以得出, 胡杨组具有较多的 st、t 染色体, 核型不对称系数比黑杨组、青杨组、大叶杨组高, 为 63.03, 胡杨的

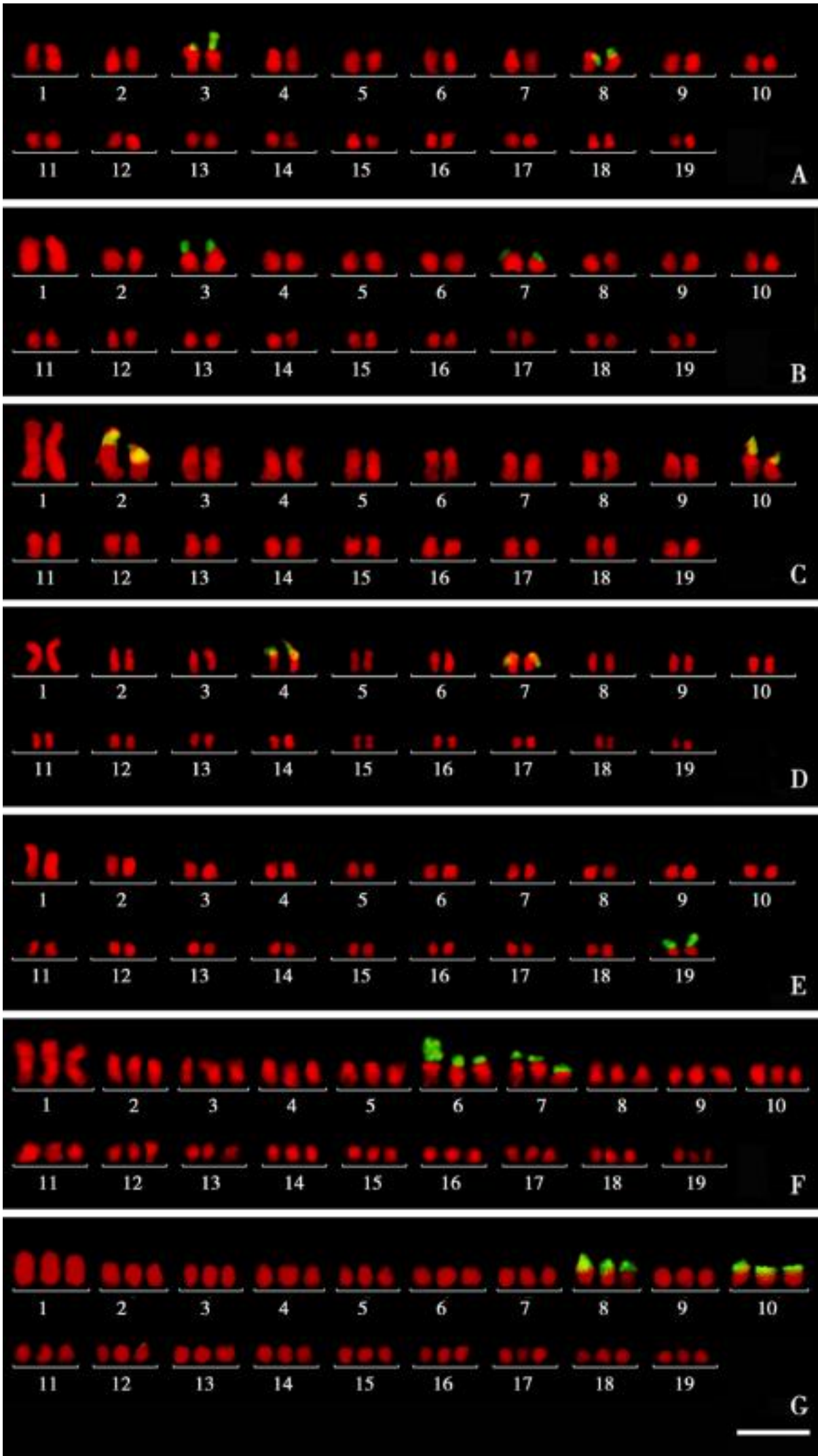


图 2 7 种植物中期染色体核型图

Fig . 2 The karyotypes of the seven species

A . *P. tomentosa* ($2n = 2x = 38$) ; B . *P. nigra* var. *thevestina* ; C . *P. pseudo-simonii* ; D . *P. lasiocarpa* ; E . *P. euphratica* ;
F . *P. tomentosa* ($2n = 3x = 57$) ; G . *P. euramericana* cv . Wuhei-1 (bar = 5 μm)

25S rDNA 的数目和位置也与其它组差异较大。而白杨组具有更高的核型不对称系数为 65.97 (陈成彬, 2005), 但其 25S rDNA 的数目和位置变化不大。

据 1935 年在新疆发现的化石推断, 胡杨距今大约有 300~600 万年的历史, 是杨属中最古老的一种 (王世绩, 1996)。干旱高盐碱的特殊生态环境保证了胡杨组与杨属其它植物发生分歧后的生殖隔离, 也保证了其基因组的原始性。胡杨组与其它组杨属植物相比, 虽然保持了核型的相似性, 但其具有较高的核型不对称系数, 根据 Stebbins (1971) 对植物界核型进化的一般规律是由对称型向不对称型发展, 核型越不对称越进化的阐述, 可见胡杨属于较进化的类型, 同时 25S rDNA 数目和位置的差异也显示在胡杨的进化过程中发生了明显的染色体变化。综合以上研究结果, 说明胡杨自身进化的动力较高, 发生了更多的染色体事件, 这种随机事件发生频率高是与环境压力相适应的 (Ayala 等, 2000)。染色体事件频率提高推动变异的产生、加速进化, 使胡杨更加适应极端的生态环境, 甚至产生了储水储碱等特异表型。

综上所述, 笔者认为在杨属植物进化的过程中, 胡杨组与其它杨属植物在 rDNA 数目和位置上存在着显著差异, 这种染色体组型的变异可为研究杨属的起源进化, 以及准确的判断胡杨在进化过程中的分歧时间提供了线索。在白杨组和黑杨组的天然三倍体中发现带有 25S rDNA 杂交信号的 3 个同源染色体的形态和信号的大小都存在着一定的差异, 这显示其可能是异源三倍体, 但这个推断还需要进一步的试验证据。

〔参 考 文 献〕

- 王世绩, 1996. 世界胡杨林的现状及保护和恢复对策 [J]. 世界林业研究, 6: 37—44
- 洪德元, 1990. 植物细胞分类学 [M]. 北京: 科学出版社, 21—22
- Ayala JF, Fitch MW, Clegg TM. 2000. Variation and Evolution in Plants and microorganisms: Toward a New Synthesis 50 Years after Stebbins [M]. National Academy Press, 211—234
- Benabdelmouna A, Abirached-Darmency M, 1997. Distribution and chromosomal organization of 18S-5.8S-25S and 5S rDNA in *Petunia* species [J]. *Agronomie*, 17: 349—360
- Bradshaw HD, Stettler RF, 1995. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. Mapping QTLs with large effects on growth, form, and phenology traits in a forest tree [J]. *Genetics*, 139: 963—973
- Chen CB (陈成彬), Qi LW (齐力旺), Zhang SG (张守攻) *et al*. 2004. The karyotype analysis of triploid poplar [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 22: 565—567
- Chen CB (陈成彬), Zhang SG (张守攻), Li XL (李秀兰) *et al*. 2005. A comparative study on the karyotypes among sections of *Populus* [J]. *Guihaia* (广西植物), 25: 338—340
- Chen RY (陈瑞阳), Song WQ (宋文芹), Li XL (李秀兰) *et al*. 1979. A new method of plant mitosis chromosome spread [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 21: 297—298
- Eckenwalder JE, 1996. Systematics and evolution of *Populus* [A]. In *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation* RF, Stettler HD, Bradshaw and PE. Jr. Heilmaneds [M]. Ottawa: NRC Research Press, 7—32
- Galasso I, Schmidt T, Pignone D *et al*. 1995. The molecular cytogenetics of *Vigna unguiculata*: the physical organisation and characterisation of 18S-25S rDNA, 5S rDNA, telomere-like sequences and a family of centromeric repetitive DNA sequences [J]. *Theor Appl Genet*, 91: 928—935
- Ji Y, De Donato M, Crane CF *et al*. 1999. New ribosomal RNA gene locations in *Gossypium hirsutum* mapped by meiotic FISH [J]. *Chromosoma* (Berlin), 108: 200—207
- Liu B (刘博), Chen CB (陈成彬), Li XL (李秀兰) *et al*. 2005. Karyotype analysis and physical mapping of 45S rDNA in eight species of *Sophora*, *Robinia* and *Amorpha* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 27 (3): 261—268
- Long EO, Dawid IB, 1980. Repeated genes in eukaryotes [J]. *Annu Rev Biochem*, 43: 727—764
- Moscone EA, Klein F, Lambrou M *et al*. 1999. Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae) [J]. *Genome*, 42: 1224—1233
- Pedersen C, Linde-Laursen, 1994. Chromosomal locations of four minor rDNA loci and a marker microsatellite sequence in barley [J]. *Chromosome Research*, 2: 65—71
- Pedrosa A, Vallejos CE, Bachmair A *et al*. 2003. Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps [J]. *Theor Appl Genet*, 106: 205—212
- Qi LW (齐力旺), Zhang SG (张守攻), Han SY (韩素英) *et al*. 2005. Karyotype analysis of section populus in *Populus* [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 32 (5): 849—853
- Qi LW (齐力旺), Zhang SG (张守攻), Han SY (韩素英) *et al*. 2004. Karyotype comparison of *Populus* sect. *Tacamahaca* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 26 (5): 537—542
- Qi ZX, Zeng H, Li XL *et al*. 2002. The molecular characterization of maize B chromosome specific AFLPs [J]. *Cell Res*, 12 (1): 63—68
- Schrader O, Budahn H, Ahne R, 2000. Detection of 5S and 25S rRNA genes in *Sinapis alba*, *Raphanus sativus* and *Brassica napus* by double fluorescence in situ hybridization [J]. *Theor Appl Genet*, 100: 665—669
- Stebbins GL, 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants [M]. London: Edward Arnold, 85—104
- Taylor G, 2002. *Populus*: Arabidopsis for forestry. Do we need a model tree? [J]. *Annu Bot*, 90: 677—687
- Unfried I, Gruendler P, 1990. Nucleotide sequence 5.8S and 25S rRNA genes and of the internal spacers from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nucleic Acids Res*, 18: 4011
- Zoldos V, Papes D, Cerbah M *et al*. 1999. Variation in rDNA locus number and position among legume species and detection of 2 linked rDNA loci in the model *Medicago truncatula* by FISH [J]. *Theor Appl Genet*, 99: 969—977